

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/CN05/000364

International filing date: 22 March 2005 (22.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: CN
Number: 200410026557.9
Filing date: 22 March 2004 (22.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 24 May 2005 (24.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

证 明

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日: 2004. 03. 22

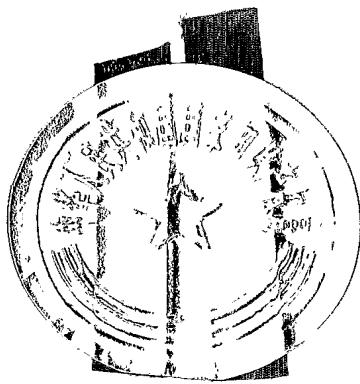
申 请 号: 200410026557. 9

申 请 类 别: 发明

发明创造名称: 皂昔类化合物治疗心血管疾病的新用途

申 请 人: 深圳中药及天然药物研究中心

发明人或设计人: 姚新生、李连达、王乃利、张荣利、陈海峰、沈平、曲戈霞



中华人民共和国
国家知识产权局局长

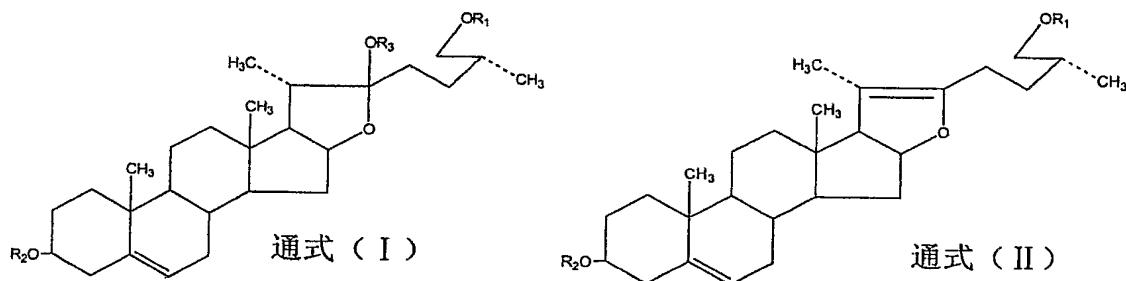
王景川

2005 年 4 月 12 日

皂苷类化合物治疗心血管疾病的新用途

1 利用多种分离手段从中药、天然药物中提取分离，或者通过合成及半合成手段获得具有通式（I）或（II）的甾体皂苷类化合物，以单体化合物或者不同比例混合组成的复方在防治心肌梗塞等心血管疾病中的应用。

具有下列通式（I）或（II）甾体皂苷类化合物结构：



通式（I）或（II）中：

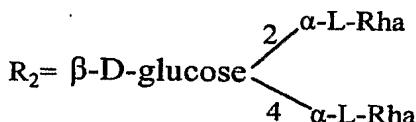
$R_1 = \beta\text{-D-葡萄糖}$

$R_2 = \beta\text{-D-直链糖链或支链糖链}$ ，其糖链组成糖的类型包括 $\beta\text{-D-葡萄糖}$ 、 $\alpha\text{-D-葡萄糖}$ 、 $\alpha\text{-L-鼠李糖}$ 、 $\beta\text{-D-半乳糖}$ 、 $\alpha\text{-D-半乳糖}$ 、 $\beta\text{-D-甘露糖}$ 、 $\alpha\text{-D-甘露糖}$ 、 $\beta\text{-D-阿拉伯糖}$ 、 $\alpha\text{-D-阿拉伯糖}$ 、 $\beta\text{-D-木糖}$ 、 $\alpha\text{-D-木糖}$ 、 $\beta\text{-D-核糖}$ 、 $\alpha\text{-D-核糖}$ 、 $\beta\text{-D-来苏糖}$ 、 $\alpha\text{-D-来苏糖}$ 、 $\alpha\text{-D-夫糖}$ 以及上述各个六碳醛糖相对应的6-去氧糖及2, 6-二去氧糖。

$R_3 = H$ 或 CH_3

1-1、一种如权利要求1所述通式为（I）的甾体皂苷类化合物 Methylprotodioscin(MPD)在防治心肌梗塞等心血管疾病中的应用，其结构为通式（I）中，

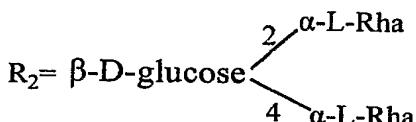
$R_1 = \beta\text{-D-glucose}$



$R_3 = CH_3$

1-2、一种如权利要求1所述的通式为（II）的甾体皂苷类化合物 Pseudoprotodioscin(PPD)在防治心肌梗塞等心血管疾病治疗中的应用，其结构为通式（II）中，

$R_1 = \beta\text{-D-glucose}$



2 如权利要求1所述通式为（I）、（II）的甾体皂苷类化合物在防治心肌梗塞等心血管疾病中的应用，其特征是：采用某个该类单体化合物或者该类化合物中不同单体按照不同比例组成的混合物制成的制剂，可用于防治心肌梗塞，冠心病，心绞痛，心率不齐，心肌缺血，高血压，高血脂，血液粘稠等多种心血管疾病。

说 明 书

皂苷类化合物治疗心血管疾病的新用途

技术领域：本发明涉及甾体皂苷类化合物 Methylprotodioscin(MPD) 与 Pseudoprotodioscin(PPD) 以单体形式或者以不同比例组成的混合物在防治心肌梗塞等心血管疾病中的应用。本发明以薯蓣属植物为原料，通过多种分离方法，纯化精制得到单体化合物 MPD 和 PPD。将二者分别以单体形式或者以不同比例组成的混合物形式，对大鼠以及犬进行抗急性心肌梗塞的药理实验。结果表明，MPD、PPD，以及两者按不同比例组成的混合物，均可有效地减少心肌梗塞范围，提示具有明显的治疗冠心病的作用和良好的研究开发前景。

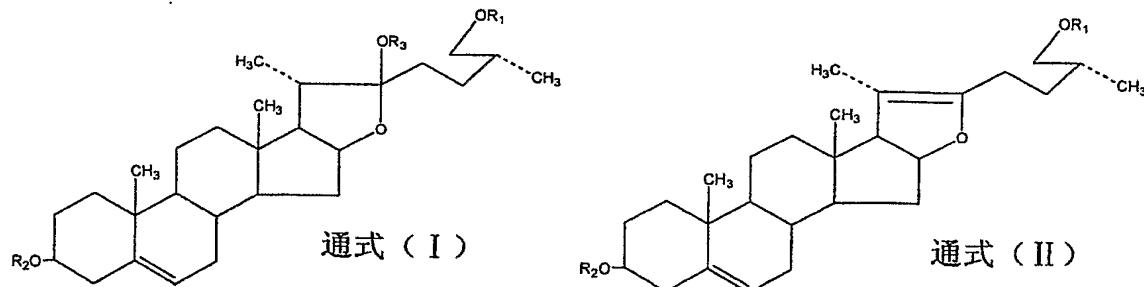
背景技术及文献：地奥心血康有扩张冠脉血管，改善大鼠心肌缺血作用，用于治疗冠心病，是现在市售最好的防治心脑血管疾病中药制剂之一。文献报道其中主要含有甾体皂苷类化学成分^[1]，中国药典 2000 年版规定采用薄层层析 (TLC) 与原料药材穿山龙或者黄山药对照进行鉴别，含量测定则采取酸水解法将总皂苷水解后用重量法测定总皂苷元的重量^[2]。有关单一呋甾皂苷类化合物以及两个单体呋甾皂苷类化合物以不同比例组成的混合物是否对心肌梗塞有缓解作用未见文献报道，也未见发表有关专利。我们以薯蓣属多种植物为原料，通过多种分离方法，纯化精制得到 Methylprotodioscin(MPD)、Pseudoprotodioscin(PPD) 以及其他多种具有上列结构通式 (I) 或 (II) 的呋甾皂苷类化合物纯品^[3-9]，并用合成方法合成了其中的 MPD^[10]。随后通过薄层层析 (TLC) 和高效液相色谱 (HPLC) 对照，确认在地奥心血康中也存在 MPD 及 PPD 等呋甾皂苷类化学成分。考虑到地奥心血康的临床应用特点，我们决定将上述单一呋甾甾体皂苷类化合物 MPD、PPD 及两者不同比例的混合物，与地奥心血康对照，采用大鼠及犬心肌梗塞动物模型进行试验，探讨并比较它们的作用，发现 MPD、PPD 以及两者以不同比例组成的呋甾皂苷类混合物对因人工结扎造成的大鼠及犬心肌梗塞模型均有明显的缓解效果，与地奥心血康相比没有统计学差异。

参考文献：

[1] 李伯刚，周正质. 新药与临床. 1994. 3(13)：2

- [2] 中华人民共和国药典 (2000 版, 一部)
- [3] 胡柯, 三种抗癌中草药的活性成分研究 (沈阳药科大学博士论文, 1998)
- [4] 沈平, 圆果三角叶薯蓣和弯蕊开口箭活性成分的研究 (沈阳药科大学博士论文, 2002)
- [5] 刘宏伟, 海绵、福州薯蓣和齿叶黄杞的化学成分及抗癌活性研究 (沈阳药科大学博士论文, 2002)
- [6] Hu, k., Dong, A. J., Yao, X. S., Et al., Antineoplastic Angents II. Four Furostanol Glycosides from Rhizomes of *Dioscorea collettii* var. *hypoglauca*, *Planta Med.*, 1997, 63, 161-165
- [7] Hu, k., Dong, A. J., Yao, X. S., Et al., A Furostanol Glycoside from *Dioscorea collettii* var. *hypoglauca*, *Phytochemistry*, 1997, 44(7), 1339-1342
- [8] Hu, k., Yao, X. S., Methyl protogracillin (NSC-698792): the spectrum of cytotoxicity against 60 human cancer cell lines in the National Cancer Institute's anticancer drug screen panel, *Anti-Cancer Drugs*, 2001, 12(6), 541-547
- [9] Liu, H. W., Kobayshi, H, Qu, G. X., Yao, X. S. A new furostanol saponin from *Dioscorea futshauensis*. *Chin. Chem. Lett.*, 2002, 13(3), 241-244.
- [10] Maosheng Cheng, Qianli Wang, Quan Tian, Hongyan Song, Yongxiang Liu, Qiang Li, Xin Xu, Hongdong Miao, Xinsheng Yao, and Zhen Yang. Total Synthesis of Methyl Protodioscin: A Potent Agent with Anti-tumor Activity. *J. Org. Chem.*

发明内容 本发明申请通式为(I)或(II)的甾体皂苷类化合物在防治心肌梗塞等心血管疾病中的新用途。



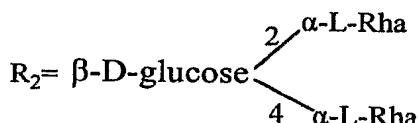
R₁=β-D-葡萄糖

R_2 =直链糖链或支链糖链，其糖链组成糖的类型包括 β -D-葡萄糖、 α -D-葡萄糖、 α -L-鼠李糖、 β -D-半乳糖、 α -D-半乳糖、 β -D-甘露糖、 α -D-甘露糖、 β -D-阿拉伯糖、 α -D-阿拉伯糖、 β -D-木糖、 α -D-木糖、 β -D-核糖、 α -D-核糖、 β -D-来苏糖、 α -D-来苏糖、 α -D-夫糖以及上述各个六碳醛糖相对应的6-去氧糖及2, 6-二去氧糖。

$R_3= H, CH_3$

通式为(I)的甾体皂苷类化合物 Methylprotodioscin(MPD)在防治心肌梗塞等心血管疾病中的应用，其结构为通式(I)中：

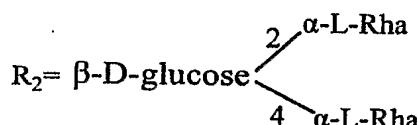
$R_1= \beta$ -D-glucose



$R_3= OCH_3$

通式为(II)的甾体皂苷类化合物 Pseudoprotodioscin (PPD) 在防治心肌梗塞等心血管疾病中的应用，其结构为通式(II)中，

$R_1= \beta$ -D-glucose



附图说明 图1 为本发明MPD对大鼠心肌梗塞范围的影响

图2 为本发明重复实验MPD对大鼠心肌梗塞范围的影响

图3 为本发明MPD对犬心肌梗塞范围的影响

图4 为本发明各给药组犬急性心肌缺血程度(N-ST)的比较(心外膜电图标测)

图5 为本发明各给药组犬急性心肌缺血范围(Σ -ST)的比较(心外膜电图标测)

图6 为本发明给药组犬冠脉流量变化比较

图7 为本发明给药组犬心肌耗氧量变化比较

图8 为本发明MPD相关各组梗塞面积百分比

具体实施方式 实施例 1: 龙胆皂苷类化合物 Methyl Protodioscin(MPD) 的提取分离

取薯蓣属植物穿龙薯蓣 (*Discorea nipponica*) 的新鲜根茎 70 kg, 用 80% 乙醇加热回流提取, 浓缩提取液, 所得提取物混悬于水中, 得到水溶解部分和水不溶解部分。将水溶解部分通过 D101 大孔吸附树脂柱, 先经用水洗脱, 然后分别用 10%、50% 及 95% 乙醇洗脱。50% 乙醇洗脱液蒸发浓缩后, 再经硅胶柱层析 (200~300 目), 以氯仿-甲醇-水 (8: 2.5: 0.01) 至甲醇梯度洗脱, 洗脱液减压回收, 合并馏分 46~50 所析出的结晶并进行重结晶得到化合物 MPD (192.6 g)。

实施例 2: 龙胆皂苷类化合物 Pseudoprotodioscin(PPD) 的提取分离

取薯蓣属植物福州薯蓣 (*Discorea futschauensis*) 的根茎 3 kg, 用 75% 乙醇加热回流提取, 浓缩提取液, 所得提取物混悬于 3000ml 水中, 用等体积的水饱和正丁醇萃取两次, 萃取液蒸发浓缩后, 再经硅胶柱层析 (200~300 目), 以氯仿-甲醇-水 (8: 2: 0.1) 至甲醇梯度洗脱, 洗脱液减压回收, 合并馏分 8~17, 再通过 ODS 柱层析, 以甲醇-水 (1: 1; 65: 35; 80: 20) 梯度洗脱, 收集 65% 甲醇洗脱部分, 经 Rp-18 高效液相制备 (70% 甲醇), 收集 40 分钟左右出现的色谱峰, 减压干燥得到化合物 Pseudoprotodioscin (100mg)。

实施例 1、2 中龙胆皂苷类化合物 Methyl Protodioscin(MPD) 和 Pseudoprotodioscin(PPD) 的理化常数:

化合物 Methyl Protodioscin(MPD): 白色粉末, mp 230~233°C (dec), $[\alpha]^{25}_D -88.7^\circ$ (c: 0.80 pyridine)。Liebermann-Burchard、Molish 和 Ehrlich 反应均呈阳性。酸水解检出葡萄糖和鼠李糖。IR_{max}: 3400~3450 (OH), 2950, 1380, 1040 (glycosylC-O)。

FAB-MS: 1085 (M+Na)⁺, 1062 (M+H)⁺, 1031 (M+H-CH₃OH)⁺, 869 (M+H-CH₃OH-Glc)⁺, 723 (M+H-CH₃OH-Glc-Rha)⁺, 577 (M+H-CH₃OH-Glc-Rha×2)⁺, 415 (M+H-CH₃OH-Glc×2-Rha×2)⁺, 397 (M+H-CH₃OH-H₂O-Glc×2-Rha×2)⁺; ¹H-NMR (C₅D₅N) δ: 0.87 (3H, s, CH₃-18), 0.98 (3H, d, CH₃-27), 1.08 (3H, s, CH₃-19), 1.03 (3H, d, CH₃-21), 1.26 (3H, d, J=6.2Hz), 1.28 (3H, d, J=6.2Hz)。 ¹³C-NMR 数据见表 2。

化合物 Pseudoprotodioscin(PPD): 白色粉末, mp 174~176°C (dec), $[\alpha]^{25}_D -64.1^\circ$

(c:0.003pyridine)。Liebermann-Burchard、Molish 和 Ehrlich 反应均呈阳性。酸水解检出葡萄糖和鼠李糖。IR_{max}: 3420 (OH), 2940 (CH), 1645, 1450, 1375, 1335, 1225, 1115, 1070, 1045, 920, 890。ESI-MS: 1053 (M+Na)⁺, 1029 (M-H)⁻, 883 (M-H-146)⁻, 737 (M-H-146×2)⁻。¹H-NMR (C₅D₅N) δ: 0.72 (3H, s, CH₃-18), 1.01 (3H, d, J=6.6 Hz, CH₃-27), 1.05 (3H, s, CH₃-19), 1.63 (3H, s, CH₃-21), 1.62 (3H, d, J=6.0 Hz), 1.76 (3H, d, J=6.3 Hz), 4.83 (1H, d, J=7.5 Hz), 4.94 (1H, d, J=6.6 Hz), 5.32 (1H, brs, H-6), 5.85 (1H, s), 6.39 (1H, s)。¹³C-NMR 数据见表 1:

表 1 Pseudoprotodioscin (PPD) 的 ¹³C-NMR 数据 (C₅D₅N)

No.	Aglycone moiety	No.	Sugar moiety
1	38.0		Glc (inner)
2	30.7	1	100.8
3	78.5	2	79.0
4	39.5	3	77.5
5	141.3	4	79.1
6	122.3	5	78.3
7	32.9	6	62.8
8	32.0		Rha (1-2)
9	50.8	1	102.5
10	37.6	2	73.0
11	21.8	3	73.3
12	40.1	4	74.6
13	43.9	5	70.0
14	55.4	6	19.1
15	35.0		Rha (1-4)
16	85.0	1	103.4
17	65.0	2	73.0
18	14.6	3	73.3
19	19.9	4	74.4
20	104.1	5	70.9
21	12.3	6	19.0
22	152.9		Glc (-26)
23	34.0	1	105.4
24	24.2	2	75.7
25	32.0	3	79.1
26	75.5	4	72.2
27	17.9	5	78.5
		6	63.4

^a Recorded on a Bruker-300 (75 MHz for ¹³C) NMR spectrometer.

表 2 MPD 的 ^{13}C -NMR 数据 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

/0

Aglycone moiety		Sugar moiety	
Position		Position	
1	37.2	Glc (inner)	
2	30.2	1	100.3
3	78.2	2	78.0
4	39.0	3	78.2
5	140.9	4	78.7
6	121.9	5	77.0
7	32.2	6	61.4
8	31.7	Rha (1→2)	
9	50.4	1	102.1
10	37.6	2	72.6
11	21.1	3	72.8
12	40.5	4	74.2
13	40.8	5	69.6
14	56.6	6	18.6
15	32.4	Rha (1→4)	
16	81.4	1	103.0
17	64.2	2	72.6
18	16.3	3	72.9
19	19.5	4	74.0
20	40.8	5	70.5
21	16.3	6	18.7
22	112.7	26-O-Glc	
23	30.9	1	105.0
24	28.2	2	75.3
25	34.3	3	78.6
26	75.3	4	71.8
27	17.2	5	78.7
22-O-CH ₃	47.3	6	63.0

^a Recorded on a Bruker-500 (125 MHz for ^{13}C) NMR spectrometer.

实施例 3：甾体皂苷类化合物 MPD 对大鼠、犬急性心肌梗塞的影响：

摘要：目的：探讨 MPD 注射剂对急性心肌梗塞的疗效及作用机制。方法：采用冠状动脉结扎急性心肌梗塞模型，观察 MPD 注射剂对大鼠和犬心肌梗塞范围、冠脉流量和心肌耗氧量等指标的影响。结果：MPD 注射剂可减小实验大鼠和犬心肌梗塞范围，改善心脏功能等作用。

结论：MPD 注射剂对心肌梗塞明显的治疗作用。

关键词：MPD 心肌梗塞

MPD 属皂苷类单体化合物，本实验观测 MPD 对于实验性心肌梗塞的疗效及机制。

1 实验材料

1.1 实验动物

Wistar 大鼠，雄性，体重 (200±20g)，由北京市通利实验动物养殖厂提供 [京物许字 (2000) 第 010 号]。

健康成年杂种犬 6 只，体重 (15.05±0.80kg)，雌雄兼用，由北京市通利实验动物养殖厂提供 [京动许字 (2000) 第 010 号]。

1.2 药物与试剂

MPD：深圳中药与天然药物研究中心姚新生院士提供。

0.9%氯化钠注射液：北京双鹤药业股份有限公司提供，批号：030208612。

地奥心血康：成都地奥制药集团有限公司提供，批号：0208096。

盐酸地尔硫卓片：天津田边制药有限公司提供，批号：0003003。

硝基四氮唑蓝 (N-BT)：购自解放军军事医学科学院药材供应站，批号：971120。

1.3 主要仪器

多道生理记录仪 (RM-6000 型，日本光电)；电动呼吸机 (SC-3 型，上海)；电磁流量计 (MF-1100 型，日本光电)；压力换能器 (MPU-0.5A)；载波放大器 (AP-601G)；微分器 (ED-601G)；血氧仪 (AVL912 型，瑞士)。多媒体彩色病理图像分析系统，MPIAS-500 型。

2 实验方法

2.1 心肌梗塞模型造模方法

3.5%水合氯醛按 10ml/kg 体重将大鼠麻醉，接呼吸机，备皮，打开胸腔，分开心包膜，暴露心脏，结扎冠状动脉左前降支根部。

3%戊巴比妥钠按 1ml/kg 将犬麻醉，开胸，暴露心脏，做心包床，放置心外膜电极，结扎冠状动脉左前降支。股静脉插管给药，颈动脉插管、颈外静脉插管至冠状静脉窦，分别取血

测动静脉血氧含量。

2.2 分组

2.2.1 预实验将 20 只大鼠随机分为模型对照组（尾静脉注射生理盐水 3ml/kg）和 MPD 组（40mg / kg），每组 10 只。

2.2.2 重复实验将 50 只大鼠随机分为模型对照组（尾静脉给生理盐水 3ml/kg），地奥心血康组（灌胃给药 40mg / kg），MPD 高剂量组（尾静脉注射 80mg/kg）、中剂量组（40mg / kg）、低剂量组（20mg / kg）5 组，每组 10 只。造模成功后 30 分钟给药 1 次，24 小时后处死动物，观测结果。

2.2.3 犬 6 只，随机分模型对照组（股静脉给药生理盐水 1ml/1kg），阳性药对照组（盐酸地尔硫卓注射液 0.5mg/kg），MPD 组（股静脉给 20mg/kg）三组，每组 2 只。测药前、给药即刻和药后 5、15、30、60、120、180min，N-ST、Σ-ST，冠状静脉窦及动脉血氧含量以及心梗范围等数据。

2.3 观测指标：

心外膜电图：N-ST 和 Σ-ST 的变化

心肌梗塞范围测定（N-BT 染色法）：动物处死后，立即取下心脏，生理盐水冲洗，用滤纸吸去水分，在结扎线以下，从心尖起平行切成等厚 4 片，置于硝基四氮唑蓝染液中，常温避光 2 分钟，用多媒体彩色病理图像分析系统测量每个切片的面积、心肌梗塞面积（N-BT 非染色区），计算心室肌总面积、心室肌梗塞总面积，计算心肌梗塞面积/心室面积（%）。

2.4 统计学处理

采用 SPSS10.0 进行统计处理，数据以 $\bar{X} \pm SD$ 表示。

3 实验结果

3.1 预实验 MPD 对大鼠心肌梗塞范围的影响

如表 1、图 1 示：模型对照组心肌梗塞范围达心室的 41.20 ± 12.25 （%），表明造模成功；MPD 组心肌梗塞范围达心室的 33.4 ± 8.09 （%），与模型对照组比较有显著性差异。

表 1 预实验对大鼠心肌梗塞范围的影响 ($\bar{X} \pm SD$)

分组	例数	剂量(/kg)	心肌梗塞面积/心室面积(%)
模型对照组	10	3ml	41.20 \pm 12.25
MPD 组	10	40mg	33.40 \pm 8.09**

注: 与模型对照组比较 ** $P < 0.01$

3.2 重复实验 MPD 对大鼠心肌梗塞范围的影响

如表 2、图 2 所示: 模型对照组心肌梗塞范围达心室的 40.99 ± 6.64 (%), 表明造模成功; 地奥心血康组心肌梗塞范围为心室的 27.24 ± 10.24 (%); MPD 组心肌梗塞范围减小, 与模型对照组相比, 高剂量组 (30.62 ± 9.46 %) 有极显著性差异, 中剂量组 (32.32 ± 6.92 %) 有显著性差异, 低剂量组 (37.89 ± 8.41 %) 有减小趋势, 但无统计学意义。

表 2 重复实验对大鼠心肌梗塞范围的影响 ($\bar{X} \pm SD$)

分组	例数	剂量(/kg)	心肌梗塞面积/心室面积(%)
模型对照组	10	3ml	40.99 \pm 6.64
地奥心血康组	10	40mg	27.24 \pm 10.24**
MPD 高剂量组	10	80mg	30.62 \pm 9.46**
MPD 中剂量组	10	40mg	32.32 \pm 6.92*
MPD 低剂量组	10	20mg	37.89 \pm 8.41

注: 与模型对照组比较 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

3.3 MPD 对犬心肌梗塞范围的影响

如表 3、图 3 所示: 模型对照组心肌梗塞范围梗塞区/心脏为 6.45 ± 1.03 (%)、梗塞区/心室 16.21 ± 1.00 (%), MPD 组心肌梗塞范围梗塞区/心脏 2.74 ± 0.33 (%)、梗塞区/心室 7.30 ± 0.97 (%), 两组比较有显著差异。盐酸地尔硫草组较模型对照组亦有明显差异。

表 3 对犬心肌梗塞范围的影响 ($\bar{X} \pm SD$)

分组	例数	剂量(/kg)	梗塞区/心脏(%)	梗塞区/心室(%)
模型对照组	2	1ml	6.45 \pm 1.03	16.21 \pm 1.00
盐酸地尔硫草组	2	0.5mg	1.81 \pm 0.79**	4.36 \pm 1.15**
MPD 组	2	20mg	2.74 \pm 0.33**	7.30 \pm 0.97**

注: 与模型对照组比较 ** $P < 0.01$

3.4 MPD 对犬心外膜电图的影响

如图 4、5 示：MPD 组对 N-ST 的影响与对照组比较未见明显变化。但两治疗组 Σ -ST 均有减少，与对照组比较有显著性差异。

3.5 MPD 对犬冠脉流量及心肌耗氧量的影响

如图 6、7 示：MPD 组对冠脉流量及心肌耗氧量未见明显影响，与对照组比较无明显差异。

4 讨 论

地奥心血康有扩张冠脉血管，改善心肌缺血的作用，常用于治疗冠心病，为本实验的阳性对照药。MPD 属皂苷类化合物，两次实验的结果表明：MPD 对冠状动脉结扎大鼠心肌梗塞有改善作用，MPD 高剂量组心梗范围减小，较模型对照组有极显著性差异，中剂量组有显著性差异，低剂量组则有下降趋势。高、中、低剂量组对于心肌梗塞范围的影响有量效趋势。实验还表明：地奥心血康组对大鼠心肌梗塞亦有改善作用，两药比较未见显著性差异。犬心肌梗塞实验也表明：MPD 静脉给药有明确治疗心肌梗塞作用。

实施例 4：甾体皂苷类化合物 PPD 对大鼠急性心肌梗塞的影响：

目的：研究 PPD 对急性心肌梗塞的治疗作用。方法：采用结扎冠脉造成急性心肌梗塞模型，观察 PPD 对大鼠心肌梗塞范围的影响。结果：PPD、MPD 对心肌梗塞范围有明显的影响。结论：MPD、PPD 可减小实验大鼠心肌梗塞范围 ($P<0.05$)，MPD 略优于 PPD。

1 实验材料

1.1 实验动物

Wistar 大鼠，雄性，体重 (170±20g)，由北京市通利实验动物养殖厂提供 [京物许字 (2000) 第 010 号]。

1.2 药物与试剂

MPD、PPD：深圳中药与天然药物研究中心姚新生院士提供。

0.9% 氯化钠注射液：北京双鹤药业股份有限公司提供，批号：030208612。

硝基四氮唑蓝 (N-BT)：购自解放军军事医学科学院药材供应站，批号：971120。

1.3 主要仪器

电动呼吸机(SC-3型, 上海); 多媒体彩色病理图像分析系统, MPIAS-500型。

2 实验方法

2.1 心肌梗塞模型造模方法

3.5%水合氯醛按10ml/kg体重将大鼠麻醉, 接呼吸机, 备皮, 打开胸腔, 分开心包膜, 暴露心脏, 结扎冠状动脉左前降支根部。

2.2 分组

2.2.1 实验一: 将12只大鼠随机分为模型对照组(灌服生理盐水5ml/kg)和PPD组(灌胃给药40mg/5ml/kg)。结扎后给药1次, 24小时后处死动物, 观测结果。

2.2.2 实验二(重复实验): 将24只大鼠随机分为模型对照组(灌服生理盐水5ml/kg)、MPD、PPD组(灌胃给药40mg/5ml/kg)。结扎后给药1次, 24小时后处死动物, 观测结果。

2.3 观测指标:

心肌梗塞范围测定(N-BT染色法): 动物处死后, 立即取下心脏, 生理盐水冲洗, 用滤纸吸去水分, 在结扎线以下, 从心尖起平行切成等厚5片, 置于硝基四氮唑蓝染液中, 常温避光2分钟, 用多媒体彩色病理图像分析系统测量每个切片的面积、心肌梗塞面积(N-BT非染色区), 计算心室肌总面积、心室肌梗塞总面积, 计算心肌梗塞面积/心脏总面积(%)。

2.4 统计学处理

采用SPSS10.0进行统计处理, 数据以 $\bar{X} \pm SD$ 表示。

3 实验结果

3.1 实验一: PPD对大鼠心肌梗塞范围的影响

如表1所示: 模型对照组心肌梗塞范围达心室的 $42.48 \pm 3.88\%$, 表明造模成功, PPD组心肌梗塞范围为心室的 $36.25 \pm 7.20\%$, 二者与模型对照组相比, 有显著性差异($P < 0.05$)。

表 1 MPD、SPR 和 PPD 对大鼠心肌梗塞范围的影响 ($\bar{X} \pm SD$)

分组	例数	剂量 (/kg)	心肌梗塞面积/心室面积 (%)
模型对照组	6	5ml	42. 48 \pm 3. 88
PPD 组	6	40mg	36. 25 \pm 7. 20*

注：与模型对照组比较 * $P < 0.05$

3.1 实验二 MPD、PPD 对大鼠心肌梗塞范围的影响（重复实验）

如表 2 所示，重复实验中可以看出，MPD、PPD 皆可明显减少心肌梗塞范围，其中以 MPD 有更明显的减少心肌梗塞面积作用，术中死亡率更低。

表 2 MPD、PPD 对大鼠心肌梗塞范围的影响 ($\bar{X} \pm SD$)

分组	例数	剂量 (/kg)	梗塞面积/全心面积 (%)	术中死亡率
模型对照组	9	5ml	41. 06 \pm 4. 98	55. 6% (5/9)
MPD 组	8	40mg	33. 71 \pm 6. 73**	0% (0/8)
PPD 组	7	40mg	36. 31 \pm 1. 90*	14. 3% (1/7)

注：与模型对照组比较 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

4 结 论

实验一结果表明：PPD 对大鼠心肌梗塞有改善作用，较模型对照组有显著性差异。为进一步验证实验结果，进行了实验二，并增加了 MPD 组。结果表明：MPD 和 PPD 灌胃给药皆可使心肌梗塞范围减小，较模型对照组有显著性差异；MPD 略优于 PPD。

实施例 5：甾体皂苷类化合物 MPD、PPD 不同比例组成的混合物对大鼠急性心肌梗塞的影响

目的：研究 MPD 与 PPD 合用对急性心肌梗塞的协同治疗作用。方法：采用结扎冠脉造成急性心肌梗塞模型，观察 MPD、PPD 按一定配比合用后对大鼠心肌梗塞范围的影响。结果：MPD、PPD 合用较单用对心肌梗塞有更好的作用。结论：MPD、PPD 合用有协同作用。

1 实验材料

1.1 实验动物

Wistar 大鼠，雄性，体重 (170 \pm 20g)，由北京市通利实验动物养殖厂提供 [京物许字 (2000) 第 010 号]。

1.2 药物与试剂

MPD、PPD: 深圳中药与天然药物研究中心姚新生院士提供, MPD+PPD 合用两者比例为 1:1

0.9%氯化钠注射液: 北京双鹤药业股份有限公司提供, 批号: 030208612。

硝基四氮唑蓝 (N-BT): 购自解放军军事医学科学院药材供应站, 批号: 971120。

1.3 主要仪器

电动呼吸机 (SC-3 型, 上海), 多媒体彩色病理图像分析系统, MPIAS-500 型。

2 实验方法

2.1 心肌梗塞模型造模方法

3.5%水合氯醛按 10ml/kg 体重将大鼠麻醉, 接呼吸机, 备皮, 打开胸腔, 分开心包膜, 暴露心脏, 结扎冠状动脉左前降支根部。

2.2 分组

将 33 只大鼠随机分为模型对照组 (灌服生理盐水 5ml/kg) 和 MPD、PPD 组和 MPD+PPD 组 (灌胃给药 40mg/5ml/kg)。结扎后给药 1 次, 24 小时后处死动物, 观测结果。

2.3 观测指标

心肌梗塞范围测定 (N-BT 染色法): 动物处死后, 立即取下心脏, 生理盐水冲洗, 用滤纸吸去水分, 在结扎线以下, 从心尖起平行切成等厚 5 片, 置于硝基四氮唑蓝染液中, 常温避光 2 分钟, 用多媒体彩色病理图像分析系统测量每个切片的面积、心肌梗塞面积 (N-BT 非染色区), 计算心室肌总面积、心室肌梗塞总面积, 计算心肌梗塞面积/心脏总面积 (%)。

2.4 统计学处理

采用 SPSS10.0 进行统计处理, 数据以 $\bar{X} \pm SD$ 表示。

3 实验结果

如表 1、图 1 所示: 模型对照组心肌梗塞范围达心室的 41.06 ± 1.66 (%), 表明造模成功; MPD 组心肌梗塞范围为心室的 36.24 ± 3.74 (%), PPD 组心肌梗塞范围为心室的 36.31 ± 1.90 (%), 二者与模型对照组相比, 有显著性差异 ($P < 0.05$), 其中又以 MPD+PPD 为最好。

18
表 1 PPD、MPD 合用对大鼠心肌梗塞范围的影响 ($\bar{X} \pm S$)

组 别	动物数	剂量 (/kg)	梗塞面积 (%)
模型对照组	9	5ml	41.06 \pm 4.98
MPD 组	8	40mg	36.24 \pm 3.74*
PPD 组	7	40mg	36.31 \pm 1.90*
MPD+PPD	9	40mg	32.74 \pm 4.90*

注：与模型对照组比较 * $P < 0.05$

4 结 论

MPD、PPD 单用及合用皆有明显的治疗实验性大鼠心肌梗塞的作用，两者按一定比例合用后可产生协同作用，在同等剂量下能达到更好的治疗作用。

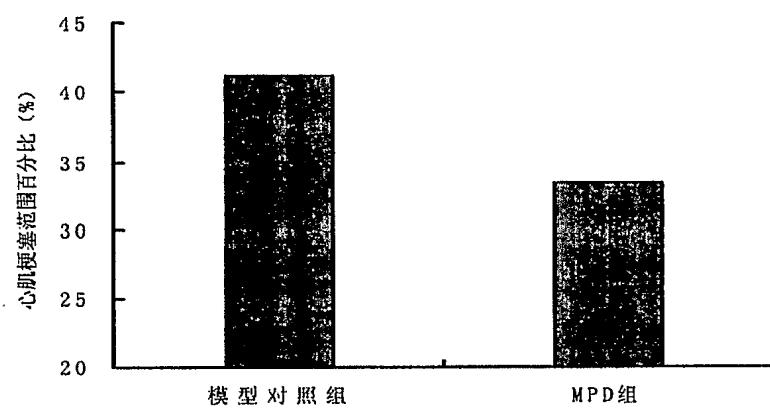


图 1

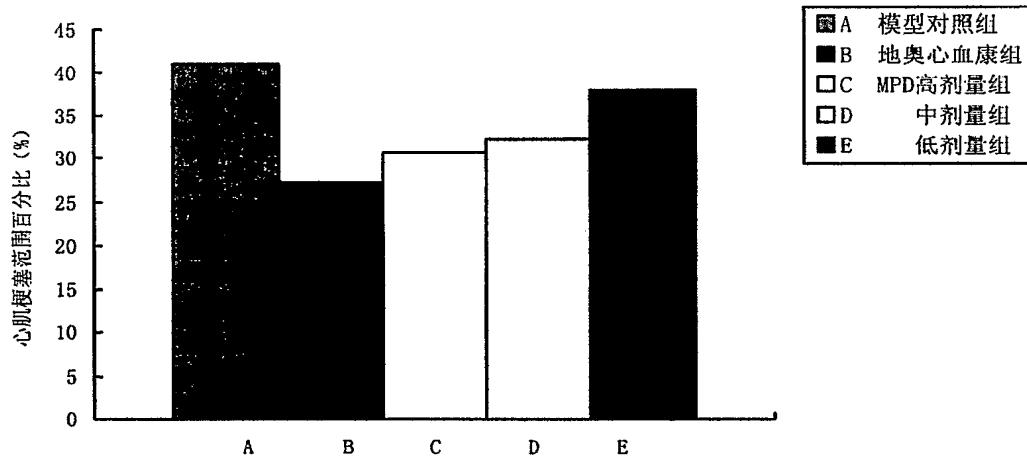


图 2

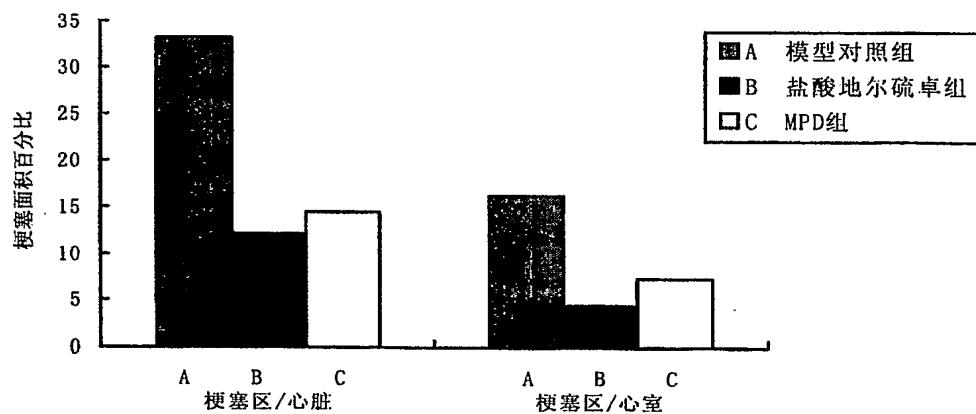


图 3

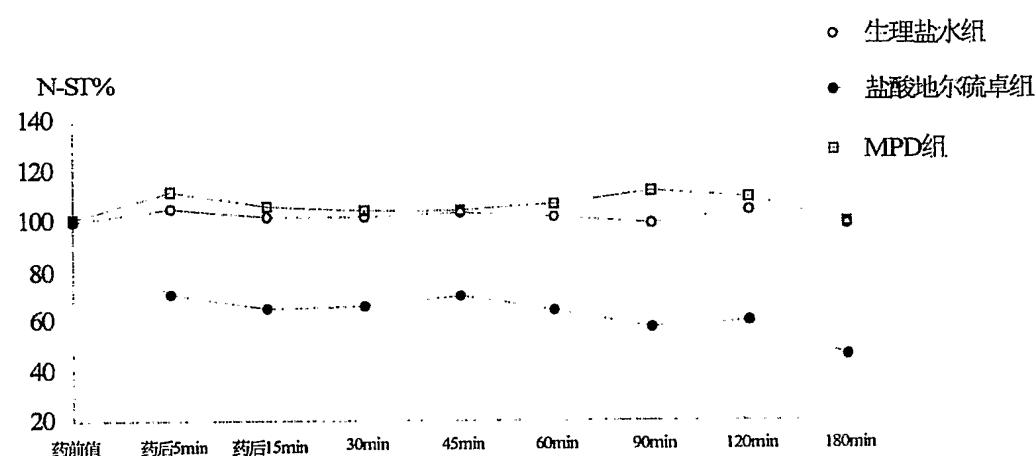


图 4

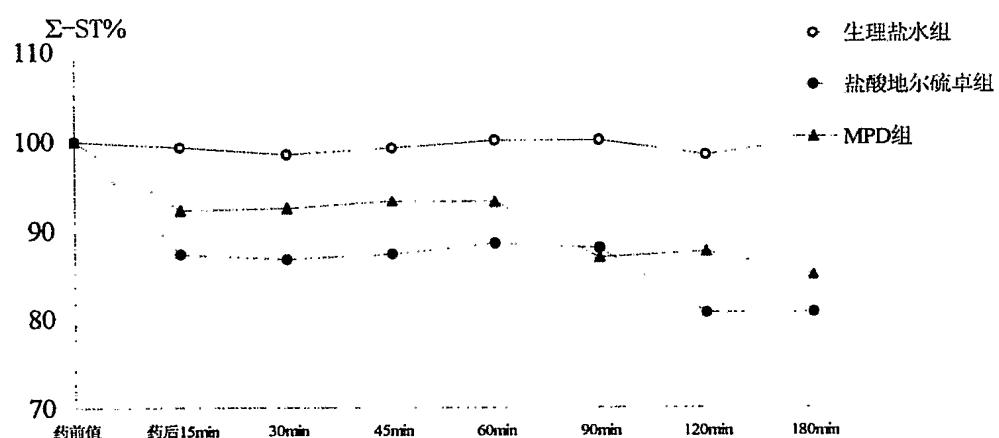


图 5

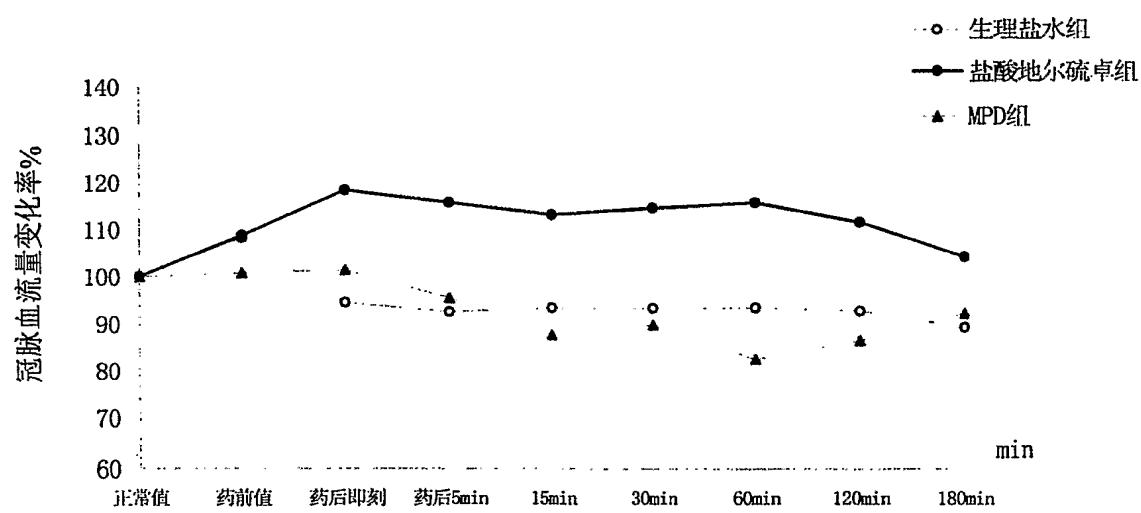


图 6

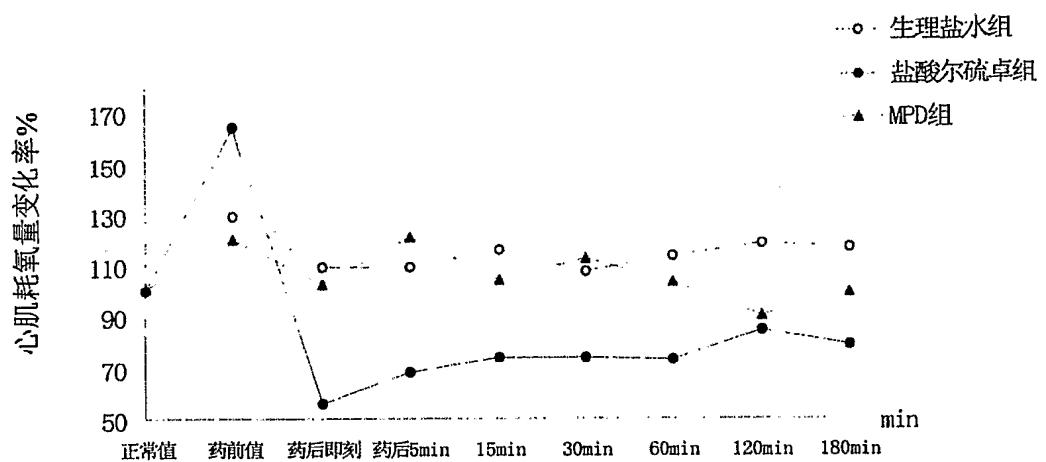


图 7

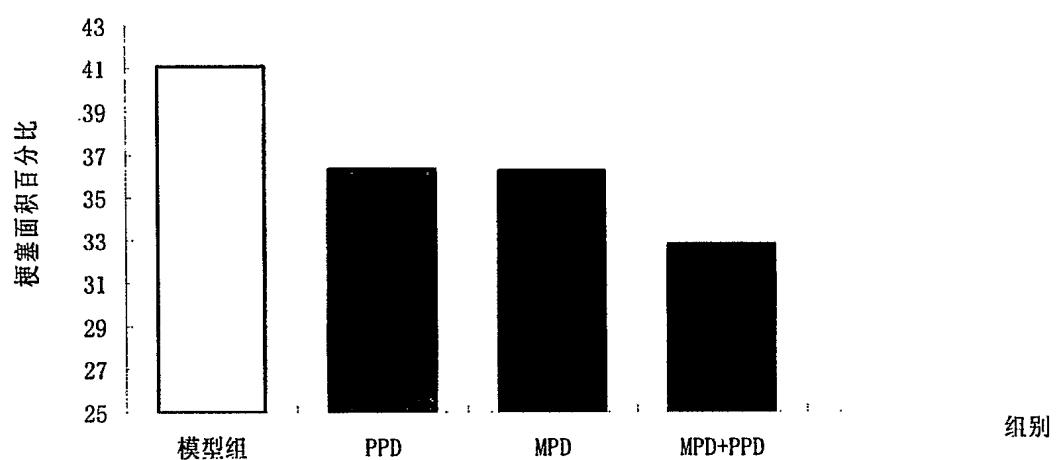


图 8